

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Use of pimaricin for the systemic therapy of infections with plasmodia or trypanosomes

Patent Number: DE3819504

Publication date: 1989-12-14

Inventor(s): ETSCHENBERG EUGEN DR MED (DE)

Applicant(s): ETSCHENBERG EUGEN DR MED (DE)

Requested Patent: DE3819504

Application Number: DE19883819504 19880608

Priority Number(s): DE19883819504 19880608

IPC Classification: A61K31/71; A61K37/22

EC Classification: A61K31/71, C07H17/08G

Equivalents:

Abstract

Use of the polyene antibiotic pimaricin (natamycin)  in combination with one (or more) phospholipid(s) in the pimaricin: phospholipid molar ratio of 0.05:1 to 1:20 for the treatment, in human and veterinary medicine, of infections with plasmodia or trypanosomes.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ ⑯ Offenlegungsschrift
⑯ ⑯ DE 38 19 504 A1

⑯ Int. Cl. 4:
A 61 K 31/71
A 61 K 37/22
// (A 61 K 35/70,
31:685)

DE 38 19 504 A1

⑯ Aktenzeichen: P 38 19 504.6
⑯ Anmeldetag: 8. 6. 88
⑯ Offenlegungstag: 14. 12. 89

⑯ Anmelder:
Etschenberg, Eugen, Dr.med., 5108 Monschau, DE

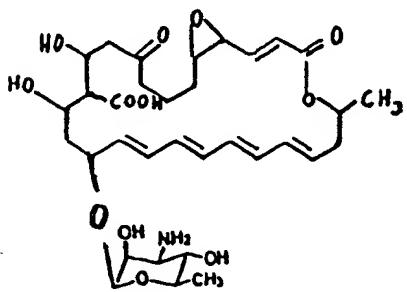
⑯ Erfinder:
gleich Anmelder

⑯ Vertreter:
Hann, M., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Sternagel, H.,
Dipl.-Chem. Dr.phil.nat., Pat.-Anwälte, 5060 Bergisch
Gladbach

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verwendung von Pimaricin zur systemischen Therapie von Infektionen mit Plasmodien oder Trypanosomen

Verwendung des Polyen-Antibiotikums Pimaricin (Nata-
mycin)



in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en)
im molaren Verhältnis Pimaricin : Phospholipiden von 0,05 : 1
bis 1 : 20 zur human- und veterinärmedizinischen Behandlung
von Infektionen mit Plasmodien oder Trypanosomen.

DE 38 19 504 A1

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist die Verwendung von Pimaricin, und zwar in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en) zur human- und veterinärmedizinischen Therapie von Plasmodien- und 5 Trypanosomen-Infektionen.

Die Behandlung von durch Plasmodien und Trypanosomen hervorgerufenen Protozoonosen, wie etwa Malaria, Trypanosomiasen (wie Chagas-Krankheit, Schlafkrankheit, Nagana-Seuchen), stellt auch bei dem heutigen, fortgeschrittenen Stand der Entwicklung von synthetischen und biogenen Chemotherapeutika ein medizinisches Problem dar.

10 Zwar ist es möglich, etwa mit Hilfe von Antimon- und Arsenpräparaten, Imidazol-Derivaten vom Metronidazol-Typ, Nitrofuran-Verbindungen, Acridiniumsalze derartige Krankheiten anzugehen. Bei sämtlichen bisher bekannten Präparaten stellen jedoch einerseits die Nebenwirkungen ein schwerwiegendes Problem dar; andererseits erschwert die rasche Resistenzentwicklung der Erreger den Therapieerfolg bei der Anwendung bislang eingeschöpfter Medikamente. Insbesondere die Überwindung der Resistenz von Plasmodien gegen herkömmliche 15 Malaria-Mittel, wie Chloroquin, stellt mit der zunehmenden Verbreitung dieser Infektionskrankheit nicht nur ein tropenmedizinisches Problem dar.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die mikrobizide Wirkung bekannter Antibiotika zur Bekämpfung von Protozoonosen auszunutzen.

In vitro und im Tierversuch (Maus) gegen Plasmodium berghei wirksame Polyen-Antibiotika mit 38gliedrigem 20 Polyen-Ring, wie Amphotericin B (z. B. D.T. Bonner, B. Mechlinski, C.T. Schaffner, The Journal of Anti-Biotics, page 261, Vol. 25, 1972), waren jedoch wegen ihrer außerordentlich hohen Säugetieroxizität als Bestandteil oral oder parenteral zu verabreichender Präparate nicht einsetzbar.

Polyen-Antibiotika sind charakterisiert als sehr wirksame, fungizide Mittel; ihre praktisch-klinische Anwendbarkeit ist jedoch aufgrund ihrer großen Toxizität sehr eingeschränkt (Waksman, Lechevalier et al, Bull. W.H.O., 25 Vol. 33, page 219, 1965; Lampen, Am.J.Clin. Path. 52, page 138, 1969). Ein weiteres Hindernis gegen eine systemische Anwendung von Polyen-Antibiotika gegen Protozoonosen stellt die äußerst geringe Löslichkeit dieser Verbindungen dar.

Bislang wird die biozide Wirkung von Polyen-Antibiotika medizinisch in lokal anzuwendenden Präparaten, und zwar in erster Linie als Fungizid (Ullmann, Enzyklopädie der Technischen Chemie, 4. Auflage, Bd. 7, S. 673, 30 Verlag Chemie, Weinheim) ausgenutzt.

Daneben findet die fungizide Wirkung von Polyen-Antibiotika, vor allem die des Pimaricins (Nata mycins) Verwendung in der Nahrungsmittel-Technologie als Schutzsubstanz in Wurst- und Käsehüllen. In neuerer Zeit ist die Bekämpfung von Pilzen, die als Nahrungsgrundlage von Hausmilben dienen, in den Vordergrund gerückt (B. Van de Maele: "A strategy in the Control of House Dust Mite Allergy", Pharma Therapeutica S. 441—444, 35 1983).

Trotz zahlreicher Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, die bei lokaler Gabe gute Wirksamkeit auch über eine orale Gabe mit systemischer Wirksamkeit — d. h. Schädigung der parasitären Zellstrukturen innerhalb des befallenen Wirtsorganismus — zu erreichen. Nur der letztgenannte Applikationsweg ist es jedoch, der eine einfache Behandlungsweise systemisch manifestierter Protozoonosen — die eben nicht lokal behandelt werden 40 können — zuläßt. Ebenso ist die systemische Therapie der einzig erfolgversprechende Weg, um zu Rezidiven neigende Haut- und Schleimhautinfektionen durch Protozoen einen nachhaltigen Erfolg zu erzielen, da die Wirkstoffe bei Lokaltherapie nicht bis in alle Schleimhautfalten vordringen können. Eine Therapie vom Blutwege her erreicht naturgemäß dieses Ziel effektiver und kann eine parallele Lokaltherapie wirksam unterstützen.

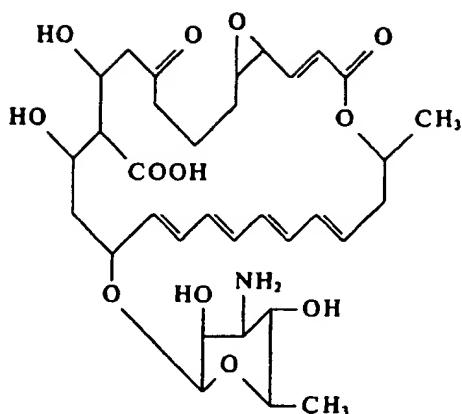
Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, angesichts der oben beschriebenen Probleme eine Möglichkeit 45 aufzuzeigen, Plasmodien und Trypanosomen bei Befall des menschlichen und tierischen Organismus in systemischer Therapie möglichst nebenwirkungsfrei Plasmodien und Trypanosomen zu bekämpfen, und vor allem ein Mittel gegen solche pathogene Protozoen, insbesondere Plasmodien zur Verfügung zu stellen, die gegen herkömmliche Präparate resistent geworden sind.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Verwendung von Pimaricin (internationaler Freiname: Nata mycin), einem seit langem bekannten Polyen-Antibiotikum mit 26gliedrigem Polyen-Ring, aus dem Kultursubstrat von *Streptomyces nataliensis* mit der Formel I

55

60

65



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

in Kombination mit Phospholipid(en), insbesondere mit Lecithin bei systemischer Gabe auch in geringer Konzentration eine starke therapeutische Aktivität hat, wenn es in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en) gemäß Patentanspruch 1 angewendet wird.

Eine Übersicht über die bisher bekannten medizinischen Eigenschaften des Pimaricins, seine Toxizität und Unlöslichkeit, bietet die Monographie W.P. Raab: "Pimaricin" G. Thieme Verlag Stuttgart 1974.

Die Unteransprüche 2 bis 7 geben zweckmäßige Ausführungsformen der Erfahrung wieder.

Die überraschende protozoen-schädigende Wirkung, die Pimaricin bei parenteraler Gabe aufweist, wenn es in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en) verabreicht wird, kann am bequemsten erreicht werden, wenn das kristalline Pimaricin in einem Phospholipid gelöst wird. Geeignete Phospholipide sind als Additiv in Antiphlogistika (DE-PS 33 46 526 und DE-PS 33 46 525) bekannt.

Während nach der Lehre der oben genannten Patente der Zusatz von Phospholipiden in erster Linie dem Schutz der Magenschleimhaut bei oraler Verabreichung des eigentlichen pharmazeutischen Wirkstoffs dient, führt die Kombination des bisher lokal als Fungizid eingesetzten Polyen-Antibiotikums Pimaricin mit derartigen Phospholipiden jedoch zur Eröffnung eines systemischen Behandlungsweges gegen ein breites Spektrum von Protozoosen.

Besonders überraschend ist dabei, daß die erfundungsgemäße Verwendung von Pimaricin Heilerfolge bei Infektion mit chloroquin-resistenten Plasmodien ermöglicht.

Die folgenden Beispiele belegen die erfundungsgemäße Wirksamkeit von Pimaricin in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en):

Beispiel 1

Wirkung gegen Plasmodien

Durch ständige Passagen, welche zur Ausschaltung von Immunreaktionen teilweise in splenektomierten Tieren erfolgten, wurde unter ständiger Erhöhung der Chloroquin-Dosierungen ein Stamm herangezüchtet, der eine Resistenz gegen $2 \times 0,9$ mg Chloroquin/Maus ip. und 100 mg Chloroquin/Vitatrinkwasser aufwies. Diese Resistenz bleibt ohne weitere Chloroquingabe über drei Monate erhalten. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß die Zellproliferation verlangsamt ist und hauptsächlich die Retikulozyten befallen sind (Carter, Diggs, "Plasmodia of Rodents" in "Parasitic Protozoa", Ed. Kreier & Baker, Allen & Unwin 1987).

Tabelle I zeigt die relative therapeutische Wirksamkeit einer Kombination von Pimaricin mit Lecithin (PILE) auf chloroquinresistente Mäuse.

Tabelle I

Wirkung von PILE (Pimarizin/Lecithin) und Chloroquin auf chloroquinresistenten Mäusestamm (Stamm Suisse weibl, 6 Wochen alt, Gewicht 25 g)

5	Substanz	Dosierung	Parasitämie (% 7. Tag)	Tod (Tage)
10	PILE	1 µg/ml Lec ip.	5 von 15	14 nach 23
	Chloroquinedi-Phosphat	0,5 mg ip.	5 von 15	13 nach 28
	Kontrolle	0,2 ml NaCl ip.	15 von 15	13 nach 15
15	PILE	5 µg/ml Lec ip.	2 von 15	3 bis zum 37. Tag
	Chloroquinedi-Phosphat	0,8 mg ip.	5 von 15	15 nach 37
	Kontrolle	0,2 ml NaCl ip.	15 von 15	15 nach 24
20	PILE	10 µg/ml Lec ip.	1 von 15	1 nach 27
	Chloroquinedi-Phosphat	1,2 mg ip.	2 von 15	14 nach 27
	Kontrolle	0,2 ml NaCl ip.	15 von 15	15 nach 17

Beispiel 2

Wirksamkeit gegen Plasmodium berghei-Infektion der Maus

25 Tabelle II zeigt, daß hinter der Wirkung von PILE der ^3H -Adenosineinbau in parasitierte Erythrozyten nahezu vollständig gehemmt ist.

Tabelle II

30 Messung der Einbauhemmung von ^3H -Adenosin in parasitierte Erythrozyten

35		Dosis µg/ml	Zeit/ Inkubation	Einbaurate ^3H -Adenosin dpm/ Parasit	% Änderung der Kontrolle
40	Kontrolle		30 min	0,30	
	Lecithin-Lösung		75 min	0,70	
			120 min	0,80	
45	PILE	1	30 min	0,15 min	-62
			75 min	0,12	-83
			120 min	0,09	-88
50	PILE	10	30 min	0,07	-82
			75 min	0,05	-93
			120 min	0,04	-98

Dieses Ergebnis wird durch Messung Einbauhemmung von Experiment 3 H-Methionin in parasitierte Erythrozyten bestätigt; der Methionineinbau wird unter der Wirkung von PILE nahezu vollständig gehemmt.

55

60

65

Tabelle III

Messung der Einbauhemmung von ^3H -Methionin parasitierte Erythrozyten

	Dosis µg/ml	Zeit/ Inkubation	Einbaurate ^3H -Adenosin dpm/ Parasit	% Änderung gegen Kontrolle	
Kontrolle		30 min	0,06		10
Lecithin-Lösung		75 min	0,12		
		120 min	0,2		
		30 min	0,02	-68	15
	10	75 min	0,04	-73	
		120 min	0,05	-76	
PILE		30 min	0,004	-93	
	100	75 min	0,0057	-95	20
		120 min	0,0075	-98	

Bei Untersuchungen an *Plasmodium berghei* Infektionen der Maus zeigte sich weiterhin, daß eine signifikante Hemmung der DNA/RNA als auch der Proteinsynthese in parasitierten Erythrozyten nachzuweisen ist. Insgesamt zeigte sich, daß die Nukleinsäuresynthese stärker gehemmt war als die Proteinsynthese. Diese Ergebnisse führten zu weiteren Untersuchungen zur Überlebensrate infizierter Mäuse. Hierzu wurden isolierte parasitierte Erythrozyten (5mal 10^6 PE/ml) mit PILE inkubiert (Hanks Balanced Salt Solution, 10% fetales Kälberserum, 0,1% Heparin bei 37°) und anschließend 0,2 ml/Maus intraperitoneal injiziert. Als Maß für die Wirkung von PILE wurde das Überleben der Tiere gewertet.

Tabelle IV

Konzentration	Lösungsmittel	Zeit (Min.) Inkubation	Parasitämie Tag Tag 7 p.o. Tiere	Tag p.i. Tage	
5 µg PILE	Lecithin	30	1 von 15	1 nach 30	40
10 µg PILE	Lecithin	45	0 von 15	0 nach 50	
Kontrolle	Lecithin	45	15 von 15	15 nach 11	

Bei der niedrigen Konzentration von 5 µg/ml tritt eine weitgehende und bei der hohen Konzentration von 10 µg/ml eine 100%ige Unterdrückung der Infektion auf. Dieser Effekt ist inkubationszeit- und konzentrations-abhängig.

Beispiel 3

Wirkung gegen Trypanosomen

5

Tabelle V

Methode: Trypanosoma brucei/NMRI-Maus Modell

10

Infektion: Tag 0, 10^5 Trypanosomen/Maus i.p.

15

Anzahl Tiere/Gruppe Kontrollen	Lösungsvermittler: Lecithin Mortalität 14 Tage p.i. Tiere	Parasitämie
Lomidine ¹⁾ 0,1 M Lösg. PILE 10 µg/ml	15 von 15 15 von 15	nicht untersucht
Dosierung (mg/kg)		
A Lomidine ¹⁾ 0,1 M Lösg. plus PILE 1 µg/ml	15 von 15	nicht untersucht
B Lomidine ¹⁾ 0,5 M Lösg. plus PILE 5 µg/ml	7 von 15	nicht untersucht
C Lomidine ¹⁾ 0,1 M Lösg. plus PILE 10 µg/ml	12 von 15	nicht untersucht
D Lomidine ¹⁾ 0,5 M Lösg. plus PILE 10 µg/ml	4 von 15	nicht untersucht
E Lomidine ¹⁾ 0,5 M Lösg. plus PILE 20 µg/ml	1 von 15	nicht untersucht

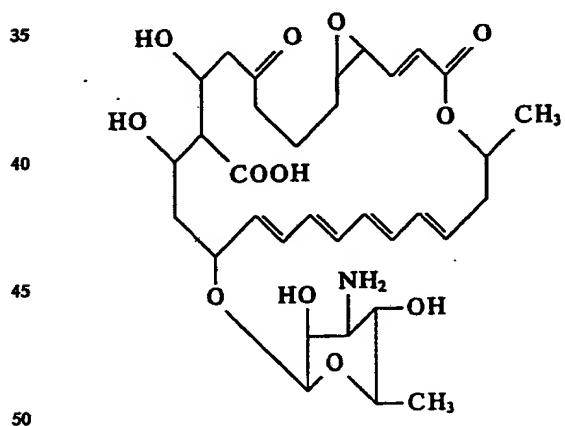
¹⁾ Lomidine[®] ist ein Anti-Trypanosomen-Präparat der Fa. Spezia, FR, das als Wirkstoff 4,4-(Pentamethylendioxy)-bis-benzimidin als Di-methan-sulfonat enthält.

30

Patentansprüche

1. Verwendung des Polyen-Antibiotikums Pimaricin (Natamycin)

35



50

in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en) zur human- und veterinärmedizinischen Behandlung von Infektionen mit Plasmodien oder Trypanosomen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Phospholipid(e) natürliche und/oder synthetische Lecithine, Glysolecithine, Kefaline, Sphingolipide, insbesondere Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglykol, Phosphatidylinnocit, bevorzugt hochreines, ggfs. hydriertes Lecithin aus Sojabohnen eingesetzt wird (werden).

3. Verwendung nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Pimaricin in Kombination mit dem (oder den) Phospholipid(en) in zur systemischen Therapie geeigneten Präparaten in einem molaren Verhältnis von Pimaricin:Phospholipid(en) eingesetzt wird, das 0,05:1 bis 1:20, bevorzugt 1:10 bis 0,5:1, beträgt.

4. Verwendung nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Pimaricin in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en), ggfs. mit weiteren pharmazeutischen Wirkstoffen und/oder pharmazeutisch unbedenklichen Zusätzen, als Injektionslösung konfektioniert ist.

5. Verwendung nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Pimaricin in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en), ggfs. mit weiteren pharmazeutischen Wirkstoffen und/oder pharmazeutischen unbedenklichen Zusätzen als Präparat zur oralen Verabreichung konfektioniert ist.

6. Pharmazeutisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyen-Antibiotikum Pimaricin in Kombination mit einem (oder mehreren) Phospholipid(en) enthält.

OS 38 19 504

7. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Phospholipid(e) natürliche und/oder synthetische Lecithine, Glysolecithine, Kefaline, Sphingolipide, insbesondere Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglykol, Phosphatidylinosit, bevorzugt hochreines, ggfs. hydriertes, Lecithin eingesetzt wird (werden).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -